

学校编码: 10384
学号: 24520081153507

密级_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抑癌基因 menin 调控 Pax2 的分子机制研究

The molecular mechanism of tumor suppressor menin
regulating Pax2

曾德泉

指导教师姓名: 金光辉 副教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩日期: 2011 年 6 月

2011 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为()课题(组)的研究成果，获得()课题(组)经费或实验室的资助，在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名)：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

以染色质共价修饰为主要标志的表观遗传调控作为整合细胞内外环境因素与基因组遗传信息的媒介,直接调控基因表达,决定细胞增殖、分化与功能特化,在生命活动中起到不可或缺的作用。*MEN1*基因(小鼠为*Men1*)是多发性内分泌肿瘤1型综合征(Multiple endocrine neoplasia type 1, MEN1)的关键致病基因之一,其编码蛋白menin为多组织表达性核蛋白。menin调控的组蛋白甲基化修饰与靶基因转录调控、疾病发生的关系是目前这一领域研究的热点。近年来的研究结果表明,menin通过与MLL等组蛋白修饰酶系统相互作用,影响组蛋白H3K4甲基化修饰和染色质结构等表观遗传学机制而调节关键靶基因表达,广泛参与细胞周期,细胞增殖,细胞迁移,细胞凋亡以及DNA损伤修复等过程。*Pax2*是调节胚胎肾脏发育的重要基因,在调节肾脏间质—上皮转化的过程中发挥关键作用,并且具有促细胞增殖的功能,在多种肿瘤的发生中扮演重要角色。基因芯片结果显示,*Men1*^{-/-} MEF细胞中*Pax2*表达量明显上调,提示menin调控的*Pax2*表达可能是实现menin生物学功能的主要信号通路之一,但其机制尚不清楚。在肺腺癌中,menin能够影响H3K27的组蛋白修饰从而抑制PTN的表达。然而,menin是否通过影响PcG家族蛋白介导的H3K27的甲基化修饰而抑制*Pax2*,尚不清楚。

本研究以*Men1*^{+/+}和 *Men1*^{-/-} MEF细胞为研究模型,采用染色质免疫共沉淀(ChIP)、免疫共沉淀(IP)等分子生物学技术探讨menin对*Pax2*的表观遗传学调控机制。通过ChIP方法,我们发现menin能够影响*Pax2*启动子区组蛋白H3K27的三甲基化水平但并不与*Pax2*的基因位点直接结合;进一步的研究结果显示,menin能上调WT1的表达,并且WT1能够影响*Pax2*启动子区组蛋白H3K27的三甲基化水平;我们通过IP证实了WT1能与DNMT1及PcG家族蛋白EZH2、SUZ12相互作用。以上结果表明:menin上调WT1的表达,WT1招募PcG家族蛋白以及DNA甲基转移酶1,使*Pax2*启动子区组蛋白H3K27三甲基化水平和DNA甲基化水平增高,进而抑制*Pax2*的转录。

本研究结果阐明了menin可通过上调WT1而以两种不同的表观遗传学修饰机制间接抑制*Pax2*的转录,将进一步揭示menin在肾胚胎发育、肾肿瘤等的生物

学意义提供理论依据。

关键词：*MEN1*基因；Pax2；WT1；组蛋白甲基化；DNA甲基化

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

As media of integration of internal and external environmental factors and genome genetic information, epigenetic regulation plays important role in cell life, including regulation of gene expression, determination of cell proliferation, differentiation and function specialization, and characterized with covalent modification of the chromatin. *MEN1* (*Men1* in mice), one virulence gene of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), encodes a nuclear protein referred to as menin which is expressed in many organizations. The research of relationship between histone methylation regulated by menin and gene regulation, the development of disease is currently hot in this area. Recent reports show that menin controls the expression of key gene via interacting with histone modification enzymes, such as MLL, and influencing the epigenetic mechanisms including H3K4 histone modification and chromatin structure. Menin is involved in cell cycle, proliferation, cell migration, apoptosis, and DNA damage repair. Pax2 is a key regulator of renal development, with the function of promoting cell proliferation. Microarray results show that menin can significantly inhibit Pax2 expression in wild-type (*Men1*^{+/+}) mouse fibroblast (MEF) cells comparing with that in menin knockout (*Men1*^{-/-}) MEF cells, but the mechanism is still unclear. In lung adenocarcinoma, menin can affect H3K27 histone modifications to inhibit the expression of PTN. However, it's not clear whether menin inhibits Pax2 expression via affecting H3K27 methylation mediated by the PcG has not been reported.

In this research, we study the epigenetic mechanism of menin on regulation of Pax2 in *Men1*^{+/+} and *Men1*^{-/-} MEF cells using ChIP, IP and other molecular biology techniques. ChIP showed that menin could influence the histone H3K27 methylation of *Pax2* promoter but did not bind to the locus of *Pax2* directly; Furthermore, menin could upregulate the expression of WT1 which sequentially affect H3K27me3 of *Pax2* promoter; We identified that WT1 interacted with DNMT1 and the PcG family protein EZH2, SUZ12 through IP. These results suggest that: menin increases the expression of WT1, and then WT1 recruits PcG and DNA methyltransferase1 to the *Pax2* promoter which increases H3K27me3 and DNA methylation, thereby inhibiting the transcription of Pax2.

Together, these studies have uncovered a novel epigenetic mechanism whereby

menin regulates H3K27me3 and promoter DNA methylation via WT1 in repression of Pax2 transcription, it will provide a theoretical basis in revealing the biological significance of menin in the embryonic kidney development and kidney tumor.

Key words: *MEN1* gene; Pax2; WT1; histone methylation; DNA methylation

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章 绪论	1
1. 基因的表现遗传学调控及其机制	1
1.1 表现遗传学.....	1
1.2 表现遗传的调控机制.....	1
1.2.1 组蛋白修饰.....	1
1.2.2 DNA 甲基化修饰	4
1.2.3 miRNA	4
2. menin 的特征、细胞表型的调节及生物学功能	5
2.1 menin 的基本特征.....	5
2.2 menin 调节的组蛋白修饰与细胞表型.....	6
2.2.1 menin 与细胞增殖.....	6
2.2.2 menin 与细胞迁移.....	8
2.2.3 menin 与 DNA 损伤修复、细胞凋亡.....	8
2.3 menin 的生物学功能.....	9
2.3.1 menin 与内分泌系统疾病.....	9
2.3.2 menin 与造血系统发育、肿瘤.....	10
3. Wilms tumor suppressor (WT1)	11
3.1 WT1 基因的结构特点	11
3.2 WT1 的功能	11
4. Pax2 基因	12
4.1 pax2 基因的结构特点.....	12
4.2 Pax2 的功能.....	12
5. 立题依据	13
第二章 材料与方法	14
1 主要试剂及器材	14
1.1 试剂.....	14

1.2 器材.....	16
2 仪器.....	16
3 质粒与菌种.....	17
4 细胞株.....	17
5 分子生物学方法.....	18
5.1 引物设计及合成.....	18
5.1.1 Real-time qPCR 引物.....	18
5.1.2 ChIP 引物.....	18
5.1.3 <i>Pax2</i> 启动子 CpG 岛 DNA 甲基化检测引物.....	19
5.2 重组质粒构建.....	19
5.2.1 全长质粒构建.....	19
5.2.2 干扰质粒构建.....	20
5.2.3 PCR 产物的 T 载体构建.....	22
5.3 感受态细胞的制备与转化.....	22
5.4 质粒扩增及其碱裂解法制备.....	23
5.5 逆转录 PCR/Real-time qPCR 检测基因 mRNA 表达水平.....	24
5.6 Western Blot 检测基因蛋白水平表达.....	25
5.7 DNA 甲基化检测.....	26
5.8 染色质免疫共沉淀(Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).....	27
5.9 免疫共沉淀.....	30
6 免疫组织化学.....	31
7 病毒包装与感染.....	31
7.1 逆转录病毒简介.....	31
7.2 病毒包装与感染.....	31
第三章 实验结果.....	33
1. <i>menin</i> 抑制 <i>Pax2</i> 的表达.....	33
1.1 <i>menin</i> 抑制 <i>Pax2</i> 的表达.....	33
2. <i>menin</i> 抑制 <i>Pax2</i> 表达的机制研究.....	35
2.1 <i>menin</i> 影响 <i>Pax2</i> 启动子区 H3K27 组蛋白修饰.....	35
2.2 <i>menin</i> 上调 WT1 的表达.....	37
2.3 WT1 影响 <i>Pax2</i> 启动子区 H3K27 组蛋白修饰.....	40
2.4 WT1 与 PcG 蛋白相互作用.....	43

2.5 DNA 甲基化对 Pax2 的调控	44
3. menin 上调 WT1 机制的研究	47
3.1 menin 对 WT1 转录水平的影响	47
3.2 menin 对 WT1 蛋白稳定性的影响	47
3.3 PI3K 通路对 WT1 的影响	48
第四章 讨论	50
参考文献.....	54
附 录.....	61
致 谢.....	62

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1. Epigenetic regulation and mechanism	1
1.1 Epigenetics	1
1.2 Epigenetic mechanism	1
1.2.1 Histone modification.....	1
1.2.2 DNA methylation.....	4
1.2.3 miRNA	4
2 . The characteristics ,phenotype and biological function of tumor suppressor gene menin	5
2.1 The characteristics of menin	5
2.2 Histone modification and phenotype regulated by menin	6
2.2.1 menin and proliferation.....	6
2.2.2 menin and migration	8
2.2.3 menin and apoptosis,DNA repair.....	8
2.3 Biological funtion of menin.....	9
2.3.1 menin and endocrine diseases.....	9
2.3.2 menin and hematopoietic system,cancer.....	10
3. Wilms tumor suppressor(WT1)	11
3.1 The characteristics of WT1 gene	11
3.2 The funtion of WT1	11
4. <i>Pax2</i> gene.....	12
4.1 The characteristics of <i>pax2</i>	12
4.2 The funtion of Pax2	12
5. Establishment.....	13
Chapter 2 Materials and methods.....	14
1 Main reagents and equipments	14
1.1 Reagents.....	14
1.2 Equipments	16
2 Instruments	16
3 Plasmids and strains.....	17

4 Cell lines	17
5 Molecular biology methods	18
5.1 Primers design and synthesis	18
5.1.1 Real-time qPCR primers	18
5.1.2 ChIP primers	18
5.1.3 <i>Pax2</i> promoter CpG island DNA methylation detection primers	19
5.2 Recombinant plasmid construction	19
5.2.1 Construction of overexpression plasmid	19
5.2.2 Construction of shRNA plasmids	20
5.2.3 Construction of PCR production to T vector	22
5.3 Preparation of competent cells and transformation	22
5.4 Plasmids amplification	23
5.5 Detection of gene mRNA expression by RT-PCR/Real-time qPCR	24
5.6 Detection of gene protein expression by Western Blot	25
5.7 Detection of DNA methylation	26
5.8 Chromatin Immunoprecipitation	27
5.9 Immunoprecipitation	30
6 Immunohistochemistry	31
7 Virus packaging and infection	31
7.1 Introduction of retrovirus	31
7.2 Virus packaging and infection	31
Chapter 3 Results	33
1. menin specifically suppresses Pax2 expression	33
1.1 menin specifically suppresses Pax2 expression	33
2. Mechanism of inhibition of Pax2 by menin	35
2.1 menin affects the histone modification at <i>Pax2</i> promoter	35
2.2 menin upregulates WT1	37
2.3 WT1 affects the histone modification at <i>Pax2</i> promoter	40
2.4 WT1 interacts with PcG	43
2.5 Regulation of Pax2 by DNA methylation	44
3. Mechanism of upregulation of WT1 by menin	47
3.1 menin affects transcription of WT1	47
3.2 menin affects stability of WT1	47
3.3 The effect of PI3K pathway on WT1	48
Chapter 4 Discussion	50

References	54
Appendices	61
Acknowledgments	62

厦门大学博士论文摘要库

第一章 绪论

1. 基因的表现遗传学调控及其机制

1.1 表现遗传学

表现遗传学(epigenetics)是研究生物表现遗传变异现象的一门遗传学分支学科。表现遗传学是指基因表达或蛋白表达的改变不涉及DNA 序列变化,但又可以通过细胞分裂和增殖而稳定遗传的现象,主要包括基因组印记、DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码RNA等^[1]。Wadding ton于1942年首次提出表现遗传学。他在研究生物体的基因型和表型之间的关系时指出,在分化的细胞中,细胞内的整套基因是始终保持不变的,但在不同的细胞中基因处在不同的工作状态。1987年, Holliday进一步指出可在两个层面研究高等生物的基因属性:第一是基因世代间传递的规律,即遗传学;第二是生物从受精卵到成体的发育过程中基因活性变化模式,即表现遗传学^[2]。表现遗传与传统意义上的遗传不同,有自身的特点,主要体现在可逆性、位置效应和高频率的突变。表现遗传修饰不仅与细胞、组织的正常发育有关,而且与肿瘤的发生也密切相关。

1.2 表现遗传的调控机制

表现遗传学调控的中心是由DNA和组蛋白组成的核小体。通过DNA甲基化修饰和组蛋白共价修饰,表现遗传学发挥其对基因表达的调控。组蛋白共价修饰与组蛋白共价修饰、DNA甲基化修饰与组蛋白共价修饰之间并不是孤立的,常常是相互作用的。例如,组蛋白H3的磷酸化有助于赖氨酸的乙酰化和甲基化,形成一种开放的染色质构象。DNA的甲基化也会影响组蛋白修饰,反之亦然。可见表现遗传调控是一个复杂的调控体系。

1.2.1 组蛋白修饰

通过组蛋白氨基末端残基的翻译后修饰对染色体结构和基因转录进行调控,是目前表现遗传学研究领域的重点之一。组蛋白氨基末端的修饰包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化以及ADP核糖基化,这些修饰能够改变DNA与组蛋白之间的相互作用,影响染色质结构的改变,从而激活或抑制靶基因的转录。单一组

蛋白的修饰往往不能独立地发挥作用,一种修饰的存在可以指导或抑制同一组蛋白上另一修饰的存在,形成一个修饰的级联。这些修饰可作为一种标志或语言,也被称为“组蛋白密码”^[3],组蛋白密码大大丰富了传统遗传密码的信息含量。在五种组蛋白修饰中,组蛋白乙酰化和甲基化尤为重要。

1.2.1.1 组蛋白乙酰化修饰

组蛋白乙酰化是最早被了解的,也是研究得最清楚的一种组蛋白修饰。组蛋白乙酰化多发生在核心组蛋白N端碱性氨基酸集中区的特定赖氨酸残基,将乙酰辅酶A的乙酰基转移到赖氨酸的 ϵNH_3^+ 中和掉1个正电荷,使DNA与组蛋白间的静电引力和空间位阻增大,两者间的相互作用减弱,DNA易于解聚,染色质呈转录活性结构,因此有利于转录因子与DNA模板相结合,进而激活基因转录。组蛋白乙酰化水平是由组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyl transferase, HATs)和组蛋白去乙酰基转移酶(histone deacetylase, HDACs)共同决定。通常认为组蛋白氨基末端赖氨酸残基的高乙酰化与染色质松散及基因转录激活有关,而低乙酰化与基因沉默或抑制有关。在细胞核内,组蛋白乙酰化与组蛋白去乙酰化过程处于动态平衡,精确地调控基因的转录和表达。Lee^[4]等在胃癌中的研究表明组蛋白H3第9位赖氨酸残基双甲基化的增加和组蛋白H3乙酰化的降低导致了由缺氧介导的RUNX相关转录因子3(RUNX3)基因的表达抑制。组蛋白去乙酰化酶异常结合到特定的启动子区从而抑制基因的正常转录功能也可能是恶性肿瘤发生的机制之一,如早幼粒细胞白血病-维甲酸受体 α 融合基因(promyelocytic leukaemia-retinoic acid receptor- α , PML-RAR α)表达的融合蛋白导致了HDAC的重新聚集,抑制了与造血细胞分化有关的基因表达,从而导致了急性早幼粒细胞白血病(APL)的发生^[5]。

1.2.1.2 组蛋白甲基化修饰

组蛋白甲基化曾被认为是一种稳定的表观遗传学标志,直到2004年第1个组蛋白去甲基化酶的发现使人们认识到组蛋白甲基化也是一种可逆的动力学过程^[6]。组蛋白甲基化一般发生在组蛋白H3、H4的赖氨酸和精氨酸残基上,赖氨酸残基能够单、双、三甲基化,而精氨酸残基能够单、双甲基化,这在很大程度上增加了组蛋白修饰的复杂性。组蛋白的甲基化都是由甲基转移酶完成的,目前从酵母到人多个物种中已经分离出十几种组蛋白H3赖氨酸甲基转移酶如MLL、

SUV39、EZH2、NSD1及Dot1等。除Dot1外,大多数组蛋白甲基转移酶中含有SET结构域,可以特异性地修饰不同的组蛋白位点,而含有SET结构域的蛋白往往与癌症的发展有密切关系。通过不同位置的甲基化标记可以判断基因是被激活还是被抑制,如H3K9、H4K20、H3K27甲基化与基因沉默有关,而H3K4、H3K36、H3K79甲基化却可以使基因活化^[7]。

Polycomb Group(PcG)蛋白是转录抑制蛋白,至少可以分成两种不同的复合物:在人体中,起始复合物(PRC2) 的中心是由EZH2、EED与SUZ12组成;维持复合物(PRC1)的中心组成成分是RNF2、HPC、EDR和BMI1^[8]。这两种复合物均与细胞周期调控和癌症有密切关系。同时在PcG的组成性蛋白中也含有SET 结构域,EZH2是一个含SET结构域的蛋白,能够特异性催化H3K27的三甲基化,改变染色质结构而抑制基因的表达^[9]。实验表明EZH2在许多癌症中过量表达^[10],但其致癌机制尚不确定。在乳腺癌细胞和前列腺癌细胞中,EZH2的表达量升高,过表达的EZH2能够使E-cadherin启动子区三甲基化水平增加,抑制其表达,增加肿瘤细胞的侵袭性^[11]。在肺腺癌中,menin能够增加PcG介导的靶基因启动子区域的H3K27的三甲基化水平,抑制多效生长因子(Pleiotrophin, PTN)的转录及其介导的细胞增殖^[12]。*HOX*基因在胚胎发育过程中发挥着重要作用,其表达也受PcG蛋白的调控。Adrian^[13]等人用ChIP的方法检测PcG蛋白与基因簇*HOXA*中不同家族成员基因位点的结合,发现EZH2和SUZ12在HOXA9-13位点的结合明显高于其他位点,并且H3K27三甲基化水平也增高,但是RNA聚合酶的结合却减少。PcG还是细胞记忆系统的组成部分,这种记忆系统能够在生物体的整个生命历程中维持目标基因的表观遗传状态^[14]。

MLL属于Trithorax家族基因,在靶基因正性调控中起重要作用^[9]。野生型MLL在蛋白水解酶Taspase1作用下剪切为MLL-N和MLL-C两部分,MLL-C端含有组蛋白甲基转移酶活性的保守的SET结构域^[15]。MLL是组蛋白H3K4的特异甲基化酶,并与其它转录因子如INI1和HAT/CBP有一定的关系。果蝇实验表明,TrxG蛋白(Trx&Ash1)并不是一般的转录共激活因子,它能阻止由PcG引起的转录抑制^[16]。MLL通过其N端的RXRFP保守序列与menin相互作用,通过使H3K4三甲基化上调HOX等基因的表达,为白血病发生和造血干细胞分化所必需^[17, 18]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库